

明治大学大学院農学研究科

2017年度

博士学位請求論文

(要約)

ユリ属 *Archelirion* 節植物の遺伝的多様性  
と園芸品種化に関する研究

Study of genetic diversity of genus *Lilium*  
section *Archelirion* and its horticultural use

学位請求者 農学専攻  
山本 将

## 第1章 序論

ユリは国内花卉産出額において単品目としてはキクの次に多く、世界的にも重要な花卉園芸植物である。ユリ属 (*Lilium* L.)は 7 つの節に分類されている。その中で *Archelirion* 節は、ヤマユリ (*L. auratum*), ヒメサユリ (*L. rubellum*), ササユリ (*L. japonicum*), ウケユリ (*L. alexandrae*), タモトユリ (*L. nobilissimum*), カノコユリ (*L. speciosum*)の 6 種とそれらの変種からなり、カノコユリ以外は全て日本固有種である。*Archelirion* 節植物の国内における分布域は種および変種により異なり、自生地では種内に形態的変異が観察されている。*Archelirion* 節のユリは花色が白色から桃色、赤色で花が大きいことから観賞価値が高く、19 世紀から海外へ輸出され園芸的に利用されている。また、ユリ園芸品種の育種では、*Archelirion* 節内の各種を交配することにより主要なユリ園芸品種群である「オリエンタルハイブリッド」として多くの品種が作出されている。さらに *Archelirion* 節植物とそれに由来する園芸品種群「オリエンタルハイブリッド」は、他節との交配により「オリエンタルトランペット(OT)ハイブリッド」「オリエンタルアジアティック(OA)ハイブリッド」「ロンギフローラムオリエンタル(LO)ハイブリッド」など多くのユリ園芸品種群が作出されており、*Archelirion* 節植物は園芸的に極めて重要である。このように本研究の対象である *Archelirion* 節植物は、ユリの園芸品種作出において重要な遺伝資源であるが、過去の研究では *Archelirion* 節植物の野生集団での遺伝的多様性はほとんど明らかにされていない。

ユリ属の DNA マーカーによる多様性解析では、過去に RAPD 法などのランダムプライマーや ISSR プライマーを用いた解析が行われてきたが、近年、マイクロサテライト(Simple Sequence Repeat; SSR)法がユリ属にも用いられるようになり、核 DNA の複数のマイクロサテライト遺伝子座を増幅可能な核 EST-SSR マーカーがユリ属の園芸品種の識別用に開発された。しかし、これらの核 SSR マーカーを野生集団に対して用いた研究はこれまでなされていない。

本研究では、形態形質の多変量解析および SSR マーカーを用いた解析を行うことで、*Archelirion* 節の各種における遺伝的多様性を明らかにし、また、自生地における種間交雑種であるイズユリ(ササユリ×ヤマユリ)野生集団間の関係性や園芸品種群「オリエンタルハイブリッド」の由来について推察することを目的とした。

## 2 各章の要約

第2章では、*Archelirion* 節の基本種で東日本に広く分布しているヤマユリに対して、形態調査と核 SSR マーカーを用いて遺伝的多様性を解析した。ヤマユリは本州のみに自生する種であり、自生地を網羅できるように調査した。形態調査は葉に関する3形質の葉長、葉幅、葉型比、花に関する11形質の外花被長、外花被幅、外花被形比（花被幅/花被長）、外花被斑点数、内花被長、内花被幅、内花被形比（花被幅/花被長）、内花被斑点数、雄蕊長、雌蕊長、雄蕊雌蕊長比、の14形質を測定した。開花期に神奈川県内9集団、長野県内2集団、茨城県、山梨県、千葉県、三重県、大阪府、静岡県、愛知県、新潟県、秋田県、岩手県内各1集団の計21集団199個体で形態を調査し、選抜した10形質を用いて多変量解析を行った。また、同様の集団から316個体でDNA抽出を行い、核 SSR マーカー7ペアを用いた PCR 増幅を行い、遺伝的多様性を評価するためにヘテロ接合度の観察値( $H_o$ )とヘテロ接合度の期待値( $H_e$ )、Allelic Richness、近交係数( $F_{is}$ )を算出した。また遺伝距離をもとにした主座標分析とクラスター解析、アサインメントテストをもとにした判別分析、ならびに Structure 解析を行った。

形態形質の多変量解析では、SPSS を用いて主成分分析とクラスター解析を行った。主成分分析の結果、各集団間を明確に区別する形質は第1主成分では外花被長、外花被幅、内花被長、内花被幅、雌蕊長であった。第1および第2主成分の散布図で、愛知と長野の集団は第1および第2主成分で正の値を示す傾向が強かった。一方、秋田、新潟の集団は第1主成分が負の値にまとまる傾向が強く、三浦、逗子、茨城の集団は第1および第2主成分で負の値になる傾向が強かった。形態形質を用いたクラスター解析では川崎、横浜、相模原からなるクラスターⅠ、厚木、愛知、大阪、静岡からなるクラスターⅡ、茨城、岩手、逗子、三浦からなるクラスターⅢ、館山、三重、秋田、新潟からなるクラスターⅣ、南足柄、下伊那、山北、真鶴、山梨からなるクラスターⅤ、小海がクラスターⅥに分かれた。

核 SSR マーカーを用いた解析の結果、316個体の合計で計51個の対立遺伝子が検出された。総対立遺伝子数および平均対立遺伝子数では秋田でそれぞれ20、2.9と最小値となり、真鶴ではそれぞれ40個、5.7個と最大値となった。集団内で近親交配がどの程度行われているのか推定する為の目安となる近交係数は、逗子集団が最小値-0.061、大阪集団が最大値0.292であった。対立遺伝子の多様性の指標となる Allelic Richness は、秋田集団が最小値1.849、三浦（神奈川）集団が最大値4.007となっ

た．集団間の遺伝的分化を表す Pairwise  $F_{st}$  と地理的距離との相関はある程度見られたが，5%水準での有意性は見られなかった．クラスター解析と主座標分析では，秋田，岩手，新潟の集団が他地域の集団より特異的であった．アサインメントテストをもとにした判別分析の結果，秋田，岩手，新潟の集団に千葉，三浦，逗子の集団が近縁な関係性があることを示し，また小海と大阪の集団は全体から離れた箇所に位置した．また山梨は近隣地域の横浜，川崎，相模原，真鶴，南足柄，から離れる結果となった．以上の結果から，ヤマユリは形態的には地域差が明確でなかった．また，種内全体の遺伝的分化は低い，東北および新潟集団で遺伝的分化が大きい事が明らかになった．

第3章では，ヤマユリの変種で伊豆諸島にのみ自生しユリ属最大の花を咲かせるサクユリ (*L. auratum* var. *platyphyllum*) について，遺伝的多様性を明らかにした．ヤマユリが花被に赤色の斑点を持つものに対して，サクユリは花被の斑点が黄色である．赤色斑点をもつサクユリは伊豆半島のヤマユリの花粉をつけた昆虫が伊豆大島に飛来し，サクユリとの交雑が起きた結果という仮説がたてられていた．その為，伊豆諸島のサクユリとその近隣地域に自生するヤマユリとの類縁関係を調べた．伊豆大島，利島，神津島，三宅島，御蔵島，青ヶ島のサクユリ 6 集団および伊豆諸島に近い本州太平洋側に自生する千葉，神奈川 3 集団，伊豆半島 3 集団のヤマユリ 7 集団から，形態調査で計 144 個体，SSR 解析で計 236 個体を材料に用いた．形態調査では外花被赤色斑点数，内花被赤色斑点数，外花被黄色斑点数，内花被黄色斑点数，外花被長，外花被幅，内花被幅，葉長，葉幅の 10 形態形質を調査し第2章と同様に解析した．

形態調査の結果，ヤマユリは外花被，内花被の両方に黄色斑点を持たなかった．また，伊豆大島，利島，神津島，三宅島，御蔵島のサクユリは花被赤色と黄色の斑点の両方を持っていたが，サクユリ内では伊豆諸島最南端の青ヶ島集団のサクユリは黄色斑点のみを有することから明確に他島の集団とは異なった．またサクユリの花被の赤色斑点数はヤマユリと比べて少なかった．形態形質の主成分分析の結果からはヤマユリとサクユリは明確に区別された．

核 SSR マーカーを用いた多様性解析の結果，サクユリでは総対立遺伝子数および平均対立遺伝子数では青ヶ島でそれぞれ 15 個，1.9 個と最小になり，伊豆大島で 42 個，1.9 個と最大になった．サクユリの  $H_o$  は 0.15 から 0.38， $H_E$  は 0.43 から 0.59， $F_{is}$  は 0.18 から 0.66 となり，集団によってはヤマユリより高い自殖傾向にあることが明らかになった．また，本州のヤマユリ集団とは Structure 解析および

クラスター解析で遠縁な結果を示し、両種の種間での自然交雑は起きていないと推定された。サクユリの集団内では伊豆大島、利島、神津島が同じクラスターになり、三宅島、御蔵島、青ヶ島とは別のクラスターで一つのまとまりを形成した。また、サクユリ各集団間の  $F_{st}$  値は 0.05 から 0.50 と高く、伊豆諸島内での遺伝的分化が進んでいることが示唆され、特に青ヶ島集団は花被の斑点が黄色のみであり、集団間の遺伝的分化を表す  $F_{st}$  値がどの集団とも大きい点から特異的と考えられた。

第 4 章では、桃色の花被を持ちそれぞれ西日本と東北地方に自生するササユリとヒメサユリにおいて解析を行った。ヒメサユリは福島県の 3 集団、新潟県の 3 集団から形態調査で計 81 個体、核 SSR 解析で計 95 個体、葉緑体 SSR 解析では 89 個体を用いた。ササユリは大阪府の集団から形態 10 個体、核 SSR 解析で 10 個体、葉緑体 SSR 解析で 10 個体を用いた。

形態調査により種間の比較では、葉長はササユリのほうが長く、葉形比はヒメサユリが有意に小さい値となった。外花被長、内花被長、内花被幅では、ササユリはヒメサユリより有意に大きくなった。ヒメサユリでは内花被と外花被に斑点が見られたが、斑点を持たない個体もあり、数ではササユリと有意な差が得られなかった、ササユリとヒメサユリを比較すると形態は明確に異なった。ヒメサユリ各集団の形質を比較した結果、南会津町と三条の集団は他集団より雄蕊の長さが長い傾向にあり、主成分分析の結果、南会津町と三条の個体は第 1 主成分が大きくまとまる傾向にあった。

核 SSR 解析の結果、 $H_o$  は西会津で 0.219 と最小で、南会津で 0.453 と最大であった。 $H_E$  は新発田で 0.57 と最小、三条で 0.70 となり最大になった。 $F_{is}$  値は西会津と三条で高い傾向にあり、Allelic richness は南会津、西会津、三条でやや高い傾向にあった。 $H_E$  についても南会津、西会津、三条で高い傾向にあった。 $F_{st}$  は新発田と村上集団の間を除いて有意となり、0.05 以上であることから集団間の遺伝的分化が認められた、しかし、遺伝的分化と距離の相関では 5% 水準で有意性はなかった。クラスター解析の結果、南会津が先ず分かれ、次に、三条の集団が分かれた。地理的に近い集団はクラスターが隣り合う傾向にあった。Structure 解析の結果、明確ではないが南会津と三条の集団はクラスター I、喜多方、西会津、新発田、村上集団ではクラスター II への分配確率が高い傾向にあった。次に、公開データベースをもとに設計した 3 ペアの葉緑体 SSR プライマーを用いて、ハプロタイプを決定した。その結果、ヒメサユリとササユリとは遺伝距離が大きく離れ、ハプロタイプも異なる結果となった。ヒメサユリでは 10 個の葉緑体ハプロタイプが得られた。南会津では 2 つの固有のタイプ

を含む最多の 5 種類のハプロタイプが得られた。また三条においても固有のハプロタイプを 2 種類もち、多様な 4 種類のハプロタイプが得られた。

核および葉緑体の両方の SSR マーカーを用いた解析の結果、南会津と三条集団は、他地域の集団とは高度に分化していることが確認された。

第 5 章ではカノキュリの多様性解析を行った。カノキュリは鮮やかな赤い花色を持ち、日本では四国と九州地方の一部に基本種のシマカノキュリ (*L. speciosum* var. *speciosum*) と変種タキユリ (*L. speciosum* var. *clivorum*) が自生、国外では台湾と中国に自生し、台湾産はタイワンカノキュリ (*L. speciosum* var. *gloriosoides*) とされる。カノキュリの国内自生地である九州の甕島 3 集団と佐世保 1 集団と、台湾 1 集団の計 4 集団を用いて形態調査と核 SSR 解析を行った。形態調査では甕島 3 集団と佐世保 1 集団、核 SSR 解析では台湾集団を加えた 41 個体を用いた。

形態調査の結果、花の色に関する主成分得点の項目が佐世保集団では小さく、花色が薄い傾向にあったが、甕島の集団とそれ以外の形質では差がなかった。

核 SSR マーカーを用いた解析の結果、 $H_o$  は 0.23 から 0.56、 $F_{is}$  値は -0.125 から 0.588 であり、ヘテロ接合度の観察値 ( $H_o$ ) と期待値 ( $H_E$ ) は上甕島では、0.42、0.70 と佐世保では 0.56、0.51 と高かった。遺伝的分化を表す  $F_{st}$  値は、甕島の集団間で低く、甕島の集団間では 0.05 から 0.09 となり遺伝的な差がほとんどないと推定された、一方甕島と佐世保の集団間では 0.34 から 0.41 と高度な分化が見られた。また、日本の集団と台湾集団との間では  $F_{st}$  値が 0.59~0.68 と非常に高度な分化が見られた。Structure 解析、主座標分析、クラスター解析の結果も同様に、台湾集団と日本の甕島の集団が大きく分かれたが、佐世保集団は甕島集団の中に含まれた。

第 6 章では、タモトユリとウケユリの解析を行った。どちらの種も白色の花を着けるが、花の向きはタモトユリが上向き、ウケユリは横向きという違いが有る。タモトユリはトカラ列島の口之島にのみ自生していたが、過去に野生絶滅しており、ウケユリは鹿児島県の奄美大島とその周辺の請島、加計呂麻島、与路島と自生地が限られていることから、両種共に栽培維持されている個体を用いた。タモトユリ 10 個体、ウケユリ 6 個体を 7 つのマーカーを用いて核 SSR 解析を行った。その結果、タモトユリは 10 個体のうち 9 個体では遺伝子型に差が見られず、7 ヶ所の遺伝子座のうち 6 ヶ所はホモ接合のみの対立遺伝子座を持っていたことから  $H_o$  と  $H_E$  は 0.11、近交係数は 1.00 となり、今回材料に

用いたタモトユリはほとんど遺伝的多様性がないと考えられた。

一方、ウケユリ 6 個体の遺伝子型は個体ごとに異なり、 $H_o$  は 0.26,  $H_E$  は 0.50 近交係数は 0.47 となり、栽培個体であってもタモトユリより遺伝的多様性を保持していると考えられる。タモトユリは少ない個体の実生による繁殖で遺伝的な固定が起きていると推定された。

第 7 章では、ササユリとヤマユリの自然交雑種と考えられ、伊豆半島のみに自生するイズユリの解析を行った。伊豆半島内の 6 集団のササユリ、4 集団のヤマユリ、10 集団のイズユリを材料に、形態調査では 154 個体、核 SSR 解析では 194 個体、葉緑体 SSR 解析では 110 個体を用いた。

形態調査の結果、ササユリ集団は開花期が 6 月上旬で伊豆半島の集団では最も早かった。花被に斑点や突起は確認されず、花色は白色またはピンク色で葉幅は 1.05~1.30cm であり葉幅は他集団より細い傾向であった。ヤマユリ集団は開花期が 7 月の中~下旬と伊豆半島の集団では最も遅く、花色は白色のみ、花被の斑点が赤色のみであった。

雑種でのササユリに類似するイズユリ ササユリ型集団は、ササユリより開花期が遅く、花被に突起が突起を持たない個体も多く、突起数の集団の平均値は 0.13~1.13 と少なかった。また、ササユリ集団と異なり柱頭色が紫の個体が見られた。雑種でヤマユリとササユリの間接型の形質を持つイズユリ集団は花被に突起と斑点を持つ個体が見られ、斑点数は外花被で 11.57, 内花被で 42.86, 葉幅は 2.04cm となり中間的な大きさを示した。雑種でヤマユリに類似するイズユリ ヤマユリ型の集団では花被が桃色、また花被斑点が黄色、また赤と黄色の両方をもつ個体が見られた点がヤマユリ集団と異なったが、花被斑点数、突起数ではヤマユリと区別できなかった。主成分分析の結果では、ササユリは第 1 主成分で負に位置し、ヤマユリは第 1 主成分で正に位置した為、明確に分かれた。イズユリ ササユリ型はササユリに近い箇所に位置したが、ササユリより第 1 主成分が大きい個体が存在した、イズユリ ヤマユリ型はヤマユリに近い場所に位置した。またイズユリ中間型はササユリとヤマユリの中間にプロットされた。

核 SSR 解析では、Structure 解析の結果、ササユリとヤマユリはクラスター分配確率が明確に分かれたが、イズユリではササユリ型、中間型、ヤマユリ型で両種のクラスターが混在する個体が見られた。アサインメントテストで得られたデータを元にした判別分析では、ヤマユリとササユリは分かれ、イズユリ ササユリ型は大部分の個体がササユリと類似したが、一部の個体はヤマユリとササユリの

間に位置した。イズユリ ヤマユリ型も同様にヤマユリに近い所に位置し、イズユリ中間型はササユリとヤマユリの間位置した。

葉緑体 SSR 解析では、ヤマユリでは 1 種類のハプロタイプ A のみ得られ、イズユリとササユリでは A と J の 2 種類のハプロタイプが得られた。これらの結果および各集団の分布から、ササユリおよびイズユリでは母系がヤマユリ由来と考えられる集団がササユリとの戻し交雑を繰り返し、葉緑体ハプロタイプはヤマユリと共通で、核および形態はササユリの集団が形成されたと考えられる。また、イズユリではササユリ型、中間型、ヤマユリ型と多様な形態型が伊豆諸半島南部で見られることから、種間交雑の中心であることが示唆された。

第 8 章では *Archelirion* 節植物から育種された園芸品種群「オリエンタルハイブリッド」および園芸品種軍「OT ハイブリッド」の解析を行った。「オリエンタルハイブリッド」52 品種、「OT ハイブリッド」17 品種の合計 69 品種を用い核 SSR 解析を行った。

その結果、クラスター1 と 2 への分配確率が高いグループ A、クラスター3 への分配確率が高いグループ B、クラスター4 への分配確率が高いグループ C の 3 つグループに大きくグループを分けることが出来たが、「オリエンタルハイブリッド」と「OT ハイブリッド」は明確には区別出来なかった。グループ C は 1 品種を除いて「オリエンタルハイブリッド」だった為「OT ハイブリッド」の作出には殆ど使用されていない可能性が示唆された。

また、ヤマユリ節 6 種計 443 個体と「オリエンタルハイブリッド」52 品種を用いた核 SSR 解析を行い、Structure 解析とアサインメントテストを行った。アサインメントテストの結果、遺伝子型の割り当ては、5 つの品種でヤマユリへの分配確率が 100 となり、20 品種でヤマユリとサクユリへの分配確立が高くなった。Structure 解析の結果「オリエンタルハイブリッド」のクラスター分配確率はサクユリ、ヤマユリと類似した傾向の品種が多く見られた。品種同士の交雑や戻し交雑を複雑に行ってきた結果、「オリエンタルハイブリッド」の交配親としては *Archelirion* の各種が使われているが交配親に使われた種には偏りがあることが示唆された。

第 9 章では総合的に *Archelirion* 節各種の遺伝的多様性を比較した、その結果、各種の遺伝的多様性の指数の比較では種ごとに異なるが、 $H_O$  と  $H_E$  の比較から、*Archelirion* 節植物は自家受粉と他家受粉の両方を行うが主に他家受粉を行う植物であることが考えられる。また、タモトユリは実生で維持さ



れているが、遺伝子座のホモ接合度が高いことから近交弱勢がおきている可能性もある。種内の遺伝的変異については、遺伝的分化は集団間の距離との相関が見られる場合が多いこと、特にサクユリやカノコユリのように集団間が海で分断される隔離により、遺伝的分化が進むことが示唆された。また、種間の関係性について解析するためにヤマユリ 192 個体、ヤマユリ変種であるサクユリ 92 個体、ササユリ 53 個体、ヒメサユリ 47 個体、タモトユリ 9 個体、ウケユリ 6 個体、カノコユリ 34 個体に核 SSR マーカーを 5 ペア用い、また各種 2 個体に葉緑体 SSR マーカー 6 ペアを用い、系統樹を用いて各種の関係性を比較した。その結果、核 SSR 解析ではタイワンカノコユリとタモトユリが近縁であり、ヤマユリ、サクユリ、ササユリ、ヒメサユリの順で近縁であるとされた。葉緑体 SSR 解析の結果、タイワンカノコユリとウケユリのクラスターが分かれ、その次にヒメサユリとヤマユリからなるクラスター、サクユリ、カノコユリ、ササユリ、タモトユリからなるクラスターの 2 つに分かれた。タモトユリとウケユリは核 SSR と葉緑体 SSR の両方でカノコユリと近縁であること、ヤマユリ、サクユリ、ササユリ、ヒメサユリは核 SSR と葉緑体 SSR では系統樹に不一致が見られた。これはササユリとヤマユリにはイズユリのような自然交雑集団があり、節内でこれらの種が近縁であることに起因すると考えられる。以上の結果より、*Archelirion* 節はカノコユリ、ウケユリ、タモトユリからなる南西部に自生するグループとヤマユリとその変種サクユリ、ササユリ、ヒメサユリからなる本州に自生する 2 つのグループに大きく分けることができた。また、*Archelirion* 節植物をもとに成立した「オリエンタルハイブリッド」などの園芸品種は核 SSR 解析の結果より本州のグループと近縁であることが分かった。

本研究の成果は日本の固有種で構成される *Archelirion* 節植物の自生地保全のガイドラインを構築する上で重要な基礎的情報を提供すると共に、ユリの育種において形態形質や遺伝的多様性において未利用の遺伝資源の存在を提示することができると考えられる。